

C4Wマウス由来線維肉腫細胞のリンパ節転移性と免疫学的性状について

| | |
|--------|---|
| 著者 | 小栗 裕 |
| 学位授与機関 | Tohoku University |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/54902 |

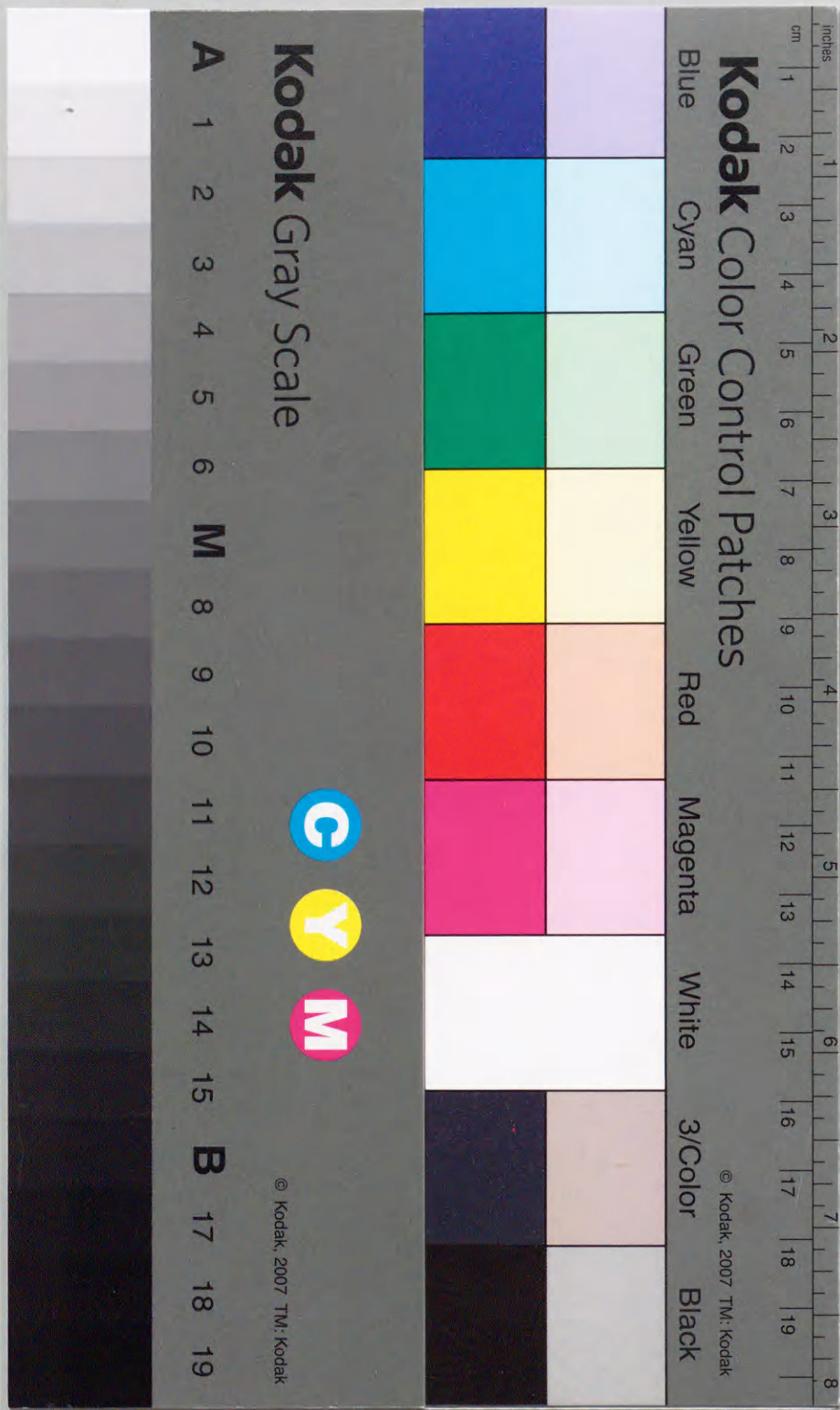
博 士 論 文

C 4 Wマウス由来線維肉腫細胞の
リンパ節転移性と免疫学的性状について

東北大学大学院医学研究科 外科学系専攻

(外科学第 2 講座)

小栗 裕



要 旨

リンパ節転移の成立機序を解明する目的でC4Wマウスを用いた実験モデルを作製した。M2B（親株）はメチルコランスレンで誘導した線維肉腫で、リンパ節転移を認めない。M2BLN-M⁺（M⁺；亜株）は、M2Bをin vivo 継代中に偶然出現したリンパ節転移巣の培養細胞をγ線照射を施したマウスに移植、その転移リンパ節より樹立した。この時、健常マウスは培養細胞を拒絶した。M2BLN-M⁺は、全例所属リンパ節に転移巣を形成する。上記モデルを用い、腫瘍細胞と所属リンパ節とが如何なる機能的相互作用を行い、又それがリンパ節転移成立の過程にどう関わっているかについて検討した。

腫瘍を⁵¹Crでラベルし、細胞障害試験をおこなった結果、M⁺はImmune Effector細胞（NK、マクロファージ、CTL）に対し、M2Bよりも、有意に細胞障害感受性が高い。しかし、担癌状態のリンパ節から検出される抗腫瘍障害活性は極めて微弱であり、これは諸家の報告に合致する。従ってEffector活性の低い状況下においてはEffector細胞に対する感受性の多寡は転移成立の要因とは考え難い。一方、³H]TdRを用いた細胞増殖試験では、Effector活性のないリンパ節細胞と共に培養した場合、M⁺は殆ど影響を受けない。ところが、M2Bはnon-immuneリンパ節細胞を加えた場合、著名な増殖抑制を受ける。リンパ節細胞のcytostatic activityは、non-T細胞（B細胞、マクロファージ）により担われており、リンパ球と腫瘍細胞との接着を断った場合にも検出された。更に、M2B担癌状態ではcytostatic activityの上昇を認めた。これらの結果は、リンパ節転移の成立の過程においてリンパ節細胞のcytostatic activityが、腫瘍細胞と所属リンパ節との初期反応の段階で、極めて重要な因子であることを示唆するものと考えられた。

序 文

リンパ行性転移は、次のような段階を経て成立すると考えられる⁹⁾。

(A) 腫瘍の（上皮基底膜を越え）結合織層への浸潤（premetastatic invasion）¹⁰⁾；腫瘍の組織内圧が高いために浮腫液の流れが生じ、この圧勾配は腫瘍細胞を毛細リンパ管へと運ぶのに重要な役割を果たしていると考えられる^{11, 12)}。

(B) 腫瘍細胞とリンパ管内皮との接触（approach）

(C) 腫瘍細胞のリンパ管内皮穿通（penetration）

(D) 腫瘍細胞のリンパ管内移動（translocation）

(E) 腫瘍細胞のリンパ節への定着、辺縁洞内での増殖（intranodal settling）

(F) 腫瘍細胞の固有リンパ洞内皮穿通、リンパ節実質内での増殖、リンパ節の崩壊（growth and destruction of the lymph node）

(G) 2次リンパ節への播種（metastasis to further nodes）；一般に1次リンパ節

崩壊前の比較的初期に出現する。あるいは、リンパ管-静脈シャントを介して1次リンパ節を経ずに運ばれる場合もある¹³⁻¹⁸⁾。

一方、リンパ節はその流域から運び込まれた抗原情報を認識し、それに応答する最初の部位である^{1, 19-21)}。

抗原情報が加わった場合、リンパ節の反応は（1）B細胞の反応としての、リンパ濾胞の拡大、芽中心の形成。（2）T細胞の反応としての、副皮質の肥厚。

（3）マクロファージの反応としての、sinus histiocytosisなどが組織学的に認められる^{9, 22-26)}。

機能的には所属リンパ節は、転移形成の初期の段階においてのみ“Barrier”としての役目を果たしていると考えられ²⁷⁻³⁰⁾、一時的に癌細胞に対抗する免疫能力を示すだけで、やがて転移癌細胞の増殖を許してしまうのが普通である^{1, 31-34)}。しかし、これらの研究はいずれもリンパ節高転移性の腫瘍細胞と所属リンパ節の反応について論じられたものである。リンパ節転移の機序は依然明らかではないが⁹⁾、癌細胞の性格とリンパ節における増殖機序が関与しているとみるべきである¹⁾。

本研究はこの観点から、メチルコランスレン誘導線維肉腫、M2B（リンパ節非転移性）及びM2BLN-M⁺（リンパ節転移性）の転移性の異なる二種の同系統腫瘍を用い、腫瘍細胞の免疫学的性格とリンパ節転移性について検索したものである。

実験材料と方法

1. 動物

C4Wマウス²⁾（雌雄）を東北大学抗酸菌病研究所の動物施設に於いてラミナフローの飼育棚、アイソラック（LSK-1 三興工業）で飼育維持し6～12週令で実験に供した。

2. 腫瘍

M2B（親株）は、メチルコランスレンでC4Wマウスに誘導した線維肉腫の培養株で、5x10⁵個以上を背部皮下に移植すると腫瘍を形成する。しかし、リンパ節転移は認めない。M2BLN-M⁺（M⁺；亜株）は、M2Bをin vivo 継代中に偶然出現したリンパ節転移巣の培養細胞をγ線照射（⁶⁰Co, 3.4Gy）を施したマウスに移植、その転移リンパ節より樹立した。この時、健常マウスは培養細胞を拒絶した。M⁺は、1x10⁵個以上を背部皮下に移植すると造腫瘍性を示し、しかも例外なく所属リンパ節（axillar, inguinal lymph nodes）に転移巣を形成する。尚、両者共、肺を含む他臓器へは転移を起こさない。

メディウムは、Dulbecco's modified essential medium（DMEM, Gibco, Grand Island, N. Y.）に非働化（56°C, 30分）した10%牛胎児血清（FBS）、10mM N-2-hydroxyethylpiperadine-

N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) 、100U/ml penicillin 、100 μ g/ml streptomycinを加えたものを用いた。

担癌マウスをcervical dislocationにより屠殺後、核出した腫瘍の酵素処理は、次の如くおこなった。壊死組織を除いた腫瘍を二本のメスを用い細切、上記メディウムに100U/mlのcollagenase (細胞分散用、034-10533 和光純薬)、0.1mg/mlのDNaseを加えた液(酵素液)中で、37°C、5~10分間インキュベートする。この操作を1~2度おこなった後、上清を捨て去り、更に2倍の濃度の酵素液中で37°C、約1時間インキュベートする。ピペティング後、上清のみを集め、遠心(1200rpm, 10分)、洗浄を3回繰り返す。途中、最低1回は細胞懸濁液の入った試験管を氷中に2分間静置、沈殿を除くようにした。このようにして得られた腫瘍細胞のviabilityは90%以上(Trypan Blue Dye Exclusion Test)であった。

腫瘍細胞の培養は、75cm² Tissue Culture Flask(CORNING 25110)を用い37°C、5%CO₂インキュベーター(NAPCO, controlled environment 5200)内で行なった。subconfluentの状態のものを実験に供した。又、confluentになった時点で0.25%Trypsin(GIBCO)-0.02% EDTA-PBSで剥がし、継代した。in vivo 継代は、担癌マウスより核出した腫瘍をブロックで、又は酵素処理後PBSに懸濁し、移植した。随時行い、腫瘍の転移性に变化のないことを確認すると共に、腫瘍を酵素処理し、適宜実験に供するか又は継代培養に回した。

3. リンパ球の採取

メディウムは RPMI1640に10%FBS、10mM HEPES、5 $\times 10^{-5}$ M 2-mercaptoethanol(2-ME)、100 U/ml penicillin、100 μ g/ml streptomycinを加えたものを用いた。マウスをcervical dislocationにより屠殺、Spleen、Lymph Nodeを4°Cに冷却したメディウム中に取り、2本のメスを用い細切、2枚のスライドグラス間で圧迫し、単離細胞の浮遊液を得る。等張塩化アンモニウム液処理(4°C, 5分)により赤血球を除いた後、遠心、洗浄を3回繰り返した後、実験に供した。Peritoneal Exudate Cell(PEC)はOK-432(中外製薬 BIA102) i.p. 4日目のマウスよりHurtら³⁾の方法に従い採取した。RPMI1640に10%FBSと10U/mlのヘパリンを加えたメディウムを腹くう内に注入し、マッサージ後屠殺、液を回収してPECの浮遊液を得た。等張塩化アンモニウム処理後、実験に供した。Assayに用いたリンパ球のviabilityは95%以上(Trypan Blue Dye Exclusion Test)であった。

4. 免疫

担癌マウスより核出した腫瘍に酵素処理後、100Gyの⁶⁰Co照射を施す。1 $\times 10^6$ 個を100 μ lのPBSにsuspendし、i.p.に注射する。これを1週間隔で3回行なう。1週後、in vivo継代腫瘍細胞でチャレンジする(M2Bの場合は5 $\times 10^5$ 個、M⁺の場合は1 $\times 10^5$ 個を背部皮下に移植する)。2週後、腫瘍の生着しないことを確認し免疫マウスとして実験に供した。

5. NK細胞分画

Polyinosinic-polycytidylic acid and poly L-lysine (Poly(I:C))⁴⁾ 0.01mgをi.v.注射し3日目のSpleen CellをNK細胞分画として用いた。

6. マクロファージ分画

OK-432 0.1mgをi.p. 4日目のPECからKumagai⁵⁾らの方法に従い、付着性細胞を回収したものをマクロファージ分画とした。

7. 抗体+補体処理

抗体は、抗体産生hybridomaの培養上清をリンパ球1 $\times 10^7$ 個当たり1mlの割合で加え、4°C、で60分間反応させた。補体(Low-Tox-M Rabbit Complement, Cedarlane Laboratories Limited, Ontario, Canada)は、RPMI1640に25mM HEPESと0.3%bovine serum albumin(BSA)を添加した溶液で10倍に希釈したものをリンパ球1 $\times 10^7$ 個当たり1ml加え、37°Cで30~60分間作用させた。

8. 単クローナル抗体

下記のhybridomaの培養上清を用いた。

| | |
|--|---|
| 30-H12 (anti-Thy1.2, ATCC, TIB107) | GK1.5 (anti-L3T4, ATCC, TIB207) |
| 53-6.72(anti-Lyt2, ATCC, TIB105) | RA3-3A1/6.1(anti-B220, ATCC, TIB146) |
| YN1/1.7.4.(anti-ICAM1, ATCC CRL1878) | 187.1(anti mouse κ , ATCC, HB58) |
| LS-136(anti mouse λ , Light chains, ATCC | TIB 157) |

9. Sephadex G-10処理

Ly and Mishell⁶⁾の方法に準じた。10mlのプラスチック製注射筒にRPMIで湿潤させたSephadex G-10を約2/3の高さまで詰め、細胞浮遊液(3~5 $\times 10^7$ /ml) 2mlをカラムにかけ、20~45分間静置後、非付着性細胞を回収した。

10. 生体内中和試験(Winn Assay)⁷⁾

Effector細胞と腫瘍細胞をE/T比 100/1で混ぜ、前日4Gyの γ 線照射を施したマウスの背部皮下に注射した。腫瘍径をslide caliperを用いて継時的に測定した。

11. CTLの誘導

in vivo継代腫瘍細胞を酵素処理後、100Gyの γ 線照射を施したものをstimulatorとし、免疫マウスのSpleen Cellをresponderとしてmixed lymphocyte tumor reaction (MLTR)を行なった。5 $\times 10^5$ ~1 $\times 10^6$ 個の照射腫瘍細胞と5 $\times 10^7$ 個のSpleen Cell (R/S=50/1~100/1)とを10%FBS、25mM HEPES、5 $\times 10^{-5}$ M 2-MEを添加したDM 10mlに懸濁し、25cm²

Tissue Culture Flask (CORNING 25100) 中で、37°C、4～5日間、CO₂-incubator 内で培養した。得られたCTLのviabilityは、75～85%であった (Trypan Blue Dye Exclusion Test)。

1 2. 試験管内細胞障害性試験 (⁵¹Cr遊離測定法)

原則として、Targetとして用いる腫瘍細胞はAssayの2日前に継代培養した。10⁶個の腫瘍細胞をペレットとし、100 μCiの⁵¹Crを含んだ クロム酸ナトリウム (New England Nuclear, Massachusetts, USA)を加え、攪拌し、37°C、1時間ラベルした。10%FBS, 10mM HEPES を加えたDMで3回洗浄後、1x10⁵/mlに調整し標的細胞として用いた。適当な比の Effector細胞 100 μlと Target細胞 100 μlを 96穴のU底の カルチャープレート (Nunc microtestplate, No.1-63320)に分注し、プレートを800rpm 2分間遠心し、37°C、5%CO₂空気下で4～18時間反応させた。培養後、上清を100 μlずつγチューブに移し、オートガンマカウンター (Auto-Gamma 500C, Packard, Illinois, USA) でcpmを測定した。実験はすべて triplicate以上で行い、⁵¹Cr標識標的細胞浮遊液100 μlに、培地100 μlを加えたものを自然遊離対照、2% NP-40 100 μlを加えたものを最大遊離対照とした。%細胞障害性を以下の式により算出した。

$$\% \text{cytotoxicity} = 100 \times \frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximam release} - \text{spontaneous release}}$$

1 3. 細胞増殖試験

a) 腫瘍細胞を5x10⁴～1x10⁵/mlの濃度に調整し、100 μlを96穴の平底のカルチャープレート (Multiwell plate, MS-8096F, SUMITOMO BAKELIFE, JAPAN)に分注、適当な比のリンパ球100 μlを加え、24～96時間、37°Cで培養した。最後の12～24時間を [³H]-thymidine [³H]TdR{29 μCi/mmol} (Amersham, UK) でラベルした。semi-automated cell harvester (PHD Cell Harvester, Cambridge Technology Inc., Cambridge, MA)を用い、細胞をglass fiber filterに採取、乾燥後scintillation vialに移す。scitillation液 (toluene 1l+ P.P.O.5g + PoPoP 0.1g)を加え、腫瘍細胞及びリンパ球に取り込まれた [³H]TdRを測定した。増殖抑制度を下記の式により算出した。

$$\% \text{Inhibition of } [^3\text{H}] \text{TdR uptake} / 100 = 1 - \frac{[\text{tumor+lymphocyte}] - \text{lymphocyte}}{\text{tumor only}}$$

b) 腫瘍細胞を2x10⁴～4x10⁴/mlの濃度に調整し、0.5mlを24穴のカルチャープレート (FALCON 3047, Becton Dickinson Labware, USA) に分注、各well内に 直径12mmの 0.45

μm Culture Plate Insert (MILLICELL-HA, Millipore) を入れ 適当な比のリンパ球をchamberに加え、腫瘍細胞とリンパ球の接触を断った状態で、1～5日間、37°Cで培養した。Insertを取り去り、プレート内の腫瘍細胞を0.25%-Trypsin-0.02%EDTA-PBSを作用させた後回収し、入念なピペティングを行い、Coulter Counterで細胞数をカウントした。増殖抑制度を下記の式により算出した。

$$\% \text{Inhibition of tumor growth} / 100 = 1 - \frac{\text{tumor+lymphocyte}}{\text{tumor only}}$$

1 4. リンパ球接着試験

腫瘍細胞を1～2x10⁵/mlに調整し、24穴のカルチャープレートにwell当たり1mlずつ分注する。12～24時間培養し、subconfluent～confluentの状態で、10%FBS, 10mM HEPES添加DM 1mlずつで3回洗浄する。⁵¹Crで標識したリンパ球を 2x10⁶/mlに調整し、0.5mlずつを各wellに分注する。37°C、5%CO₂空気下で、1時間インキュベート後、メディウムで5回洗浄する。その後、1%SDS-0/5%NaOH 0.5mlを加え、残存したリンパ球のcpmをγカウンターで測定した。リンパ球の接着度を下記の式により算出した。

$$\% \text{ lymphocytes bound} = 100 \times \frac{0.5 \text{ml lysate}}{0.5 \text{ml original lymphocytes}}$$

1 5. 腫瘍集積試験

腫瘍細胞を⁵¹Crで標識し、PBSに浮遊させ、1x10⁶ ずつ マウスの footpadに 移植、popliteal lymphnodeに集まる腫瘍細胞のcpmを測定した。

1 6. 組織学的検索

組織を切りだして10%ホルマリンで固定し、アルコールで脱水し、キシロールに透徹した後、パラフィンに包埋し、2 μmの切片を作り、Hematoxylin-Eosin染色後、検鏡した。

1 7. 免疫染色

A B C法により、行った。

1 8. 推計学的検定

studentのt検定により、有意差判定を行った。

結 果

1. 培養細胞株M2BLN-M⁺ (M⁺) の樹立

In vitro の観察では、M⁺は親株のM2Bに比べ均一な付着性の細胞集団から成り、重層傾向が強い(図1)。

M⁺は 1×10^5 個以上の背部皮下移植で造腫瘍性を示し、且つ例外なく所属リンパ節に転移巣を形成する。図2は 1×10^6 個を移植、3週後のaxillar lymph nodeの組織所見である。M⁺を移植したマウスのリンパ節では、subcapsular sinusに腫瘍の増殖を認め、inter follicular space, 更に一部 follicleへも浸潤している。一方、M2Bを移植したマウスのリンパ節には germinal centerの形成が認められるが、転移は形成されていない。以下、このモデルにおいて腫瘍細胞の免疫学的性格の差異を明らかにし、リンパ節転移性との関連について検索した。尚、ハイブリダイゼーション法により、マイコプラズマ感染のないことを確認のうえで実験に供した。

2. CTLの誘導及びCTLに対する細胞障害感受性

免疫マウスのspleen cellを*in vivo*継代腫瘍細胞で刺激し、CTLを誘導、12時間の⁵¹Cr-release assayを行った。M⁺で誘導したCTLをeffectorとした場合、M⁺は強く障害されるが、M2Bの受ける障害は軽度である(図3 上段)。M2Bで誘導したCTLをeffectorとした場合、M2Bは細胞障害を受ける。しかし、障害度は比較的弱い。又、同時に、このeffectorによりM⁺の方がむしろ強い細胞障害を受けることがわかった(図3 下段)。M⁺で免疫したspleen cellからは、M⁺に対し 障害性を示すCTLが誘導されたが、M2Bで免疫したspleen cellからは、M2Bに対するよりもM⁺に対して強い障害性をもつCTLが誘導された。この結果は、M⁺、M2Bに共通する抗原のあることを示唆すると共に、CTLに対する細胞障害感受性を比較した場合、M⁺はM2Bよりも障害感受性が高いことを示している。尚、これらのeffectorの細胞障害活性は、抗Lyt-2抗体と補体処理により低下した。又、spontaneous releaseは20%以下であった。

3. NK細胞に対する細胞障害感受性

Poly(I:C)をi.v.注射し、NK活性を高めたspleen cellをeffectorとして、4時間の⁵¹Cr-release assayを行った。このeffectorは、YAC-1(Mouse lymphoma, ATCC CRL 6362)に対し、強い障害活性をしめす。腫瘍細胞の受ける障害は比較的小さいが、NK細胞に対する細胞障害感受性を比較すると、M⁺の方がM2Bよりも有意に高いことがわかった(図4)。尚、このEffectorの細胞障害活性は、抗asialo-GM₁抗体と補体処理により消失した。又、spontaneous releaseは10%以下であった。

4. 活性化マクロファージに対する細胞障害感受性

OK-432をi.p.に注射したマウスのPECの付着性分画をeffectorとして、18時間の⁵¹Cr-release assayを行った。マクロファージに対しても、M⁺はM2Bよりも細胞障害感受性が高いことがわかった(図5)。spontaneous releaseは30%以下であった。

5. 担癌状態及び健常状態のリンパ節細胞の細胞障害活性

*In vitro*において、M⁺は、エフェクター細胞により細胞障害を受けやすい性格をもつことが判明したが、*In vivo*では、M⁺を移植されたマウスは全例リンパ節転移を形成する。そこで次に、担癌状態のリンパ節のエフェクター活性を調べた。*In vivo*継代腫瘍細胞 1×10^6 個を背部皮下に移植、1週後のaxillar, inguinal lymph nodesより担癌状態のリンパ節細胞を得た。4時間の⁵¹Cr-release assayでは、担癌状態のリンパ節細胞からcytotoxic activityは全く検出されなかった。健常状態においても同様に検出されなかった。尚、spontaneous releaseは10%以下であった。

6. エフェクター活性のないnon-immuneリンパ節細胞(健常状態)の腫瘍増殖抑制作用

健常、担癌状態共に、リンパ節細胞からはcytotoxic activityが検出されないことが確認されたわけであるが、次にcytostatic activityについて検討した。 5×10^3 個の腫瘍細胞を健常マウスのリンパ節細胞と72時間co-cultureし、最後の24時間の[³H]TdRの取込を調べた。エフェクター活性のないnon-immuneリンパ節細胞と共に培養した場合、M⁺は殆ど影響を受けない。ところが驚くべきことに、M2Bはこれらリンパ節細胞の共存によって顕著な増殖抑制を受けることがわかった。又、腫瘍細胞を、Sephadex G-10カラムを通したリンパ節細胞と48時間co-cultureした場合も全く同様の結果が得られた(図6)。尚、リンパ球単独の[³H]TdRの取込は通常、腫瘍細胞の取込の1%以下であった。更に、20~30Gyの⁶⁰Co照射リンパ節細胞を用いても全く同様の結果が得られた。

7. 担癌状態のリンパ節細胞の腫瘍増殖抑制作用

健常マウスのリンパ節細胞からcytotoxic activityは検出されないが、cytostatic activityが検出され、M2Bの方がM⁺よりも強い増殖抑制を受けることがわかった。次に、担癌状態のリンパ節細胞のcytostatic activityを調べた。*In vivo*継代腫瘍細胞 5×10^3 個を背部皮下に移植1週後のリンパ節細胞と共に、 5×10^3 個の腫瘍細胞を72時間培養し、最後の24時間の[³H]TdRを調べた。M⁺担癌状態においては健常状態に比べ有意差を認めなかった。しかし、M2B担癌状態においては、リンパ節細胞のcytostatic activityは増強される傾向を認めた(図7)。次に腫瘍細胞及びL細胞(ATCC, CRL 6362) 5×10^3 個を担癌状態のリンパ節細胞と66時間co-cultureし、最後の18時間の[³H]TdRの取込を調べた。L細胞に対して、M2B担癌のリンパ節細胞はM⁺担癌のリンパ節細胞よりも強い増殖抑制作用を及ぼすことがわかった(図8)。すなわち、リンパ節細胞のcytostatic activityに関し、M2Bは感受性、誘導能共M⁺より高いことが明らかになった。

8. リンパ節細胞の腫瘍増殖抑制作用

リンパ節細胞より検出される cytostatic activityについて更に検討を加えた。

Sephadex G-10カラムを通した健常マウスのリンパ節細胞を、抗体と補体で処理した後、 5×10^3 個の腫瘍細胞とco-cultureし、最後の24時間の $[^3\text{H}]\text{TdR}$ の取込を調べた。その結果、抗Thy-1.2抗体と補体で処理したリンパ球分画と共に培養した場合に、M2Bの増殖抑制度は更に上昇することがわかった(図9)。次に、culture plate insertを用い、腫瘍細胞とリンパ節細胞との接着を断った状態で細胞増殖試験を行った(材料と方法13-b)。24穴のカルチャープレートに 1×10^4 個の腫瘍細胞を分注し、insertを入れ、上にリンパ節細胞を分注し、114時間培養後、insertを除き腫瘍細胞数をcoulter counterで調べた。その結果、接着を断ってもM2Bは強い増殖抑制を受けることがわかった(図10)。尚、リンパ節細胞分画のマーカーを免疫染色により調べた結果は、Thy-1陽性細胞が約70%、B220陽性細胞が20~30%で、Mac-1陽性細胞は認められなかった。

9. マクロファージ(resident)の腫瘍増殖抑制作用

マウスのリンパ節からマクロファージを集めるのは困難であることが判明したので、健常マウスのPECから集めたマクロファージ(resident)を用い、細胞増殖試験を行なった。その結果、M2Bはマクロファージによっても強い増殖抑制を受けることがわかった(図11)。

考 察

リンパ節高転移性株M⁺は、転移リンパ節の*in vivo*継代を30代繰り返したのちに樹立されたが、この時点で移植局所の腫瘍とリンパ節に転移した腫瘍のあいだに転移性の差は認めていない。又、M2B、M⁺共に*in vivo*における転移性は終始安定していた。前者は全くリンパ節転移を認めず、後者は全例リンパ節に転移巣を形成した(図12)。

一般にメチルコランズレン誘導肉種は免疫原性が強く、spleenを強く刺激して全身的抗腫瘍免疫を強く誘導するといわれる³⁴⁾。M⁺の場合にも、免疫マウスのspleen cellに抗腫瘍活性が誘導された。又、M2Bの場合にも、Winn assayの結果、免疫マウスのspleen cellは腫瘍中和活性を示した(データ省略)。そこで、免疫マウスのspleen cellから*in vitro*でCTLを誘導し、細胞障害試験を行なったところ、CTLに対する細胞障害感受性は明らかにM⁺の方がM2Bより高いことが判明した(図3)。NK細胞(図4)、マクロファージ(図5)に対する細胞障害感受性もM⁺の方がM2Bより高い。

しかし担癌状態のリンパ節細胞の障害活性を調べてみると、4時間の ^{51}Cr -release assayではM2B担癌、M⁺担癌いずれの場合のリンパ節細胞からもcytotoxic activityは全く検出されなかった。尚、E/T比を100/1以上にして12~18時間のassayを行なうと、

M⁺に対しては多少障害性を示すが、この時もM2Bは全く障害を受けない(データ省略)ことより、担癌状態におけるリンパ節細胞の細胞障害活性は極めて微弱であると考えられる。MM48乳癌細胞を用いた吉田の研究でも、担癌状態のリンパ節細胞からはキラー制御活性が認められたが、キラー活性は検出されなかった³²⁾。又、健常状態においてもリンパ節及び胸管リンパ液にはNK細胞及びキラー活性は殆ど存在しないことが報告されている³⁵⁻³⁷⁾。これらの結果は、リンパ節転移がEffector活性の低い状況下で形成されることを示している。従って、このような状況下においては、リンパ節細胞と腫瘍細胞の相互作用を考える上で、エフェクター細胞に対する障害感受性の多寡はリンパ節転移形成の要因とは考え難い。

次に、腫瘍細胞の増殖に及ぼすリンパ節細胞の効果を、細胞増殖試験により調べた。M⁺の増殖はリンパ節細胞と共に培養しても殆ど影響を受けない。しかし、M2Bはリンパ節細胞の共存により顕著な増殖抑制を受けることがわかった(図6)。又、リンパ節細胞の示すcytostatic activityは、Sephadex G-10カラムを通した場合にも同様に認められた。更に、リンパ節細胞のcytostatic activityは、M⁺担癌状態においては不変または低下する傾向を示すのに対し、M2B担癌状態の場合上昇する傾向が認められた(図7)。すなわち、リンパ節細胞のcytostatic activityに関し、M2Bは感受性、誘導能共M⁺より高いといえる(図6~図8)。Sephadex G-10カラムを通したリンパ節細胞を抗体と補体で処理し、B cell enriched populationにするとcytostatic activityは上昇し、B cell depleted populationにするとcytostatic activityは低下した(図9)。又、腫瘍細胞とリンパ節細胞の接着を断った状態でもcytostatic activityは検出された(図10)。実験に用いたリンパ節細胞分画にはMac-1陽性の細胞が含まれないことが判明したので、PECより集めたマクロファージを用いて細胞増殖試験を行なったところ、マクロファージによってもM2Bは強い増殖抑制をうけることがわかった。これらの結果はcytostatic activityとしてリンパ節から検出されるファクターが、non-T細胞(B細胞、マクロファージ)及び液性の因子により担われている可能性を強く示唆するものである。

リンパ節細胞より検出されるcytostatic activityは、M2B特異的なものではなく、L細胞にも作用した(図8)。又、健常マウスのリンパ節細胞からも検出される(図6)ことを考慮すると、もともと環境因子としてリンパ節に備わっているものと考えるのが妥当と思われる。しかし、culture中にstimulationを受けて分泌される可能性も否定できない。

転移性のM⁺は宿主細胞のもつ腫瘍細胞増殖阻止能に抵抗性をもち、リンパ節細胞との共存が可能であり、これが転移性の一因となる可能性を示唆していると考えられた。

腫瘍細胞とリンパ球の接着性を、Chin³⁸⁾らの方法に準じbinding assayを行なうことにより調べたが、有意な差は認めなかった(データ省略)。リンパ球の接着分子として代表的なLFA-1³⁹⁾(lymphocyte-function-associated antigen-1)のリガンドであるICAM-1(intercellular adhesion molecule-1)の発現を両腫瘍細胞について免疫染色に

より調べたが、明らかな違いは観察されなかった。又、TNF- α を含むある種のcytokineは接着分子の発現を増強させることが知られており^{38, 40, 41)}、TNF- α (PAC4D, 旭硝子)で腫瘍細胞をpre-incubate後binding assayを行なったが、接着性はコントロール(健常マウスのskin fibroblast)に比べ上昇を認めなかった。尚、TNF- α は両腫瘍細胞の増殖に影響を与えない(データ省略)。これらの結果もcytostatic activityとして検出されるリンパ節細胞の効果が、腫瘍細胞とリンパ球の接着に基くものではないことを示している。

Cytotoxic activityとCytostatic activityの比較を表1に示した。

さて、リンパ行性にリンパ節へ移行した腫瘍細胞がマクロファージの豊富な辺縁洞に定着し、B細胞の豊富な皮質へと浸潤する⁹⁾ものとすれば、転移形成の初期の段階では腫瘍細胞と辺縁洞～皮質の細胞との相互作用をとくに考慮する必要がある。本研究で得られた結果は、リンパ節転移の初期の段階における腫瘍細胞と所属リンパ節との機能的相互作用を考える上で、示唆にとんだものといえる。あるいは、血行性転移の場合に認められる腫瘍の転移の臓器選択性⁴²⁾を意味するものとも考えられ、興味深い。

Carter⁴³⁾は、転移する移植腫瘍と同系統の転移しない移植腫瘍を用い、リンパ節における両腫瘍細胞の動態を組織学的に追った研究で、転移しない腫瘍はリンパ節に到達するが増殖巣として形成されず、どん食される所見があるとしている。M2B担癌のリンパ節でそのような組織像は得られていないが、腫瘍集積試験の結果では、腫瘍を移植した側のpopliteal lymph nodeから全経過中、spleen、血液(0.2ml)、肺などに比し高値のc.p.m.が検出され(データ省略)、M2Bにもリンパ節への移行が認められることを示している。M2B担癌状態においてcytostatic activityが上昇する理由は明らかではないが、germinal center hyperplasia, follicular hyperplasiaの像が組織学的にリンパ節に認められ、これらは何らかの影響を及ぼしている可能性が高いと思われる。M⁺の場合、リンパ節に到達した時点で増殖抑制を受けず集塊となりうるため、リンパ節内に留まり易く、一方、M2Bの場合、最初に強い増殖抑制を受けるため、単一の細胞としてリンパ節を通過し易いといった機序も関与している可能性もあるが、確証は得られていない。

リンパ節転移が複数の段階を経て成立するものである以上、腫瘍細胞の単一の性格により転移性が規定されるとは思われないが、本研究で示された結果は、cytotoxic activityを持たないnon-immuneリンパ節細胞と腫瘍細胞の相互作用が、転移形成の初期の段階で極めて重要な因子であることを示唆している。

参考文献

- 1) 橘 武彦: 実験腫瘍のリンパ節転移その免疫学的考察. *Oncologia*, 23: 7-14, 1990.
- 2) Odaka T, Ikeda H, Yoshikura H, Moriwaki K, Suzuki S.: Fv-4: Gene controlling resistance to NB-tropic Friend murine leukemia virus. Distribution in wild mice, introduction into genetic background of BALB/c mice, and mapping of chromosomes. *J. Natl. Cancer Inst.*, 67: 1123-1127, 1981.
- 3) Hurt SN, Berke G, Clark W.: A rapid method for generating cytotoxic effector cells in vivo. *J. Immunol. Methods.*, 28: 321, 1979.
- 4) Zhang S-R and Salup RR.: Augmentation of NK activity and/or macrophage-mediated cytotoxicity in the liver by biological response modifiers including human recombinant interleukin 2. *Cancer Immunol. Immunother.*, 21: 19-25, 1986.
- 5) Kumagai K, Itoh K, Hinuma S, Tada M.: Pretreatment of plastic petri dishes with fetal calf serum. A simple method for macrophage isolation. *J. Immunol. Methods.*, 29: 17-25, 1979.
- 6) Ly IA and Mishell RI.: Separation of mouse spleen cells by passage through columns of Sephadex G-10. *J. Immunol. Methods.*, 116: 1447, 1976.
- 7) Winn HJ.: Immune mechanism in homotransplantation. II. Quantitative assay of immunologic activities of lymphoid cells stimulated by tumor homograft. *J. Immunol.*, 86: 228-239, 1960.
- 8) Kriessling R, Klein E, Wigzell H.: "Natural" killer cells in the mouse. 1. cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Specificity and distribution according to genotype. *Eur. J. Immunol.*, 5: 112-117, 1975.
- 9) Carr I.: Lymphatic metastasis. *Cancer Metastasis Rev.*, 2: 307-317, 1983.
- 10) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa S, Hart I, Foltz CM, Shafie S.: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature*, 284: 67-68, 1980.

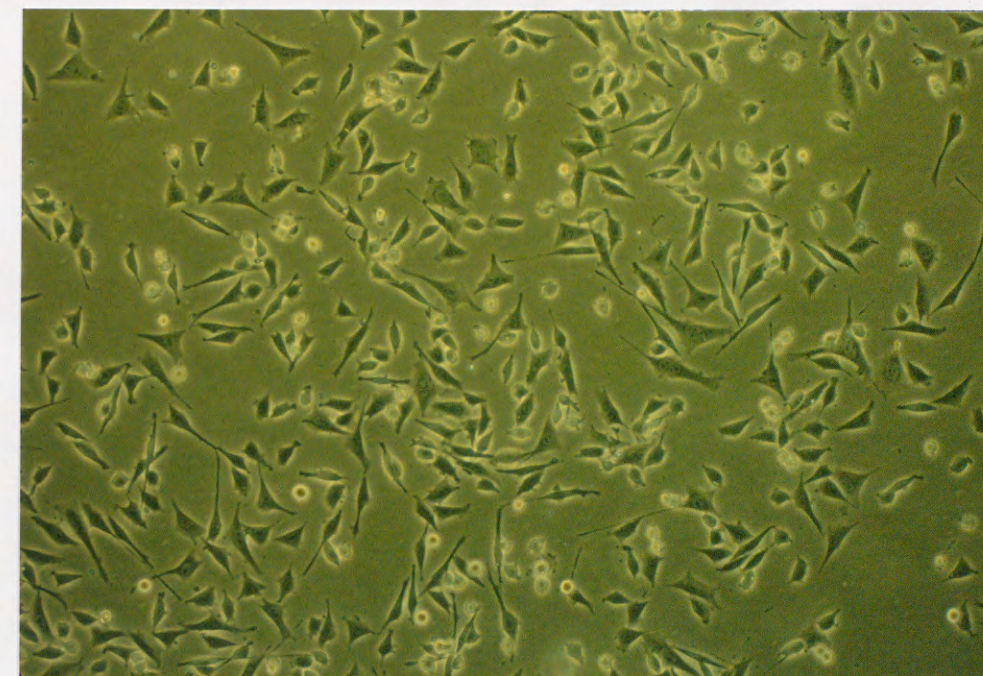
- 11) Casley-Smith JR.: The functioning and interrelationships of blood capillaries and lymphatics., *Experimentia*, 32: 1-12, 1976.
- 12) Butler TP, Grantham FH, Gullino PM.: Bulk transfer of fluid in the interstitial compartment of mammary tumors. *Cancer Res.*, 35: 3084-3088, 1975.
- 13) Fisher B and Fisher ER.: The interrelationship of hematogenesis and lymphatic tumor cell dissemination. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 122: 791-798, 1966.
- 14) Fisher B and Fisher ER.: Barrier functions of lymph node to tumor cells and erythrocytes. I. Normal nodes. *Cancer*, 20: 1907-1913, 1967.
- 15) Fisher B and Fisher ER.: Barrier functions of lymph node to tumor cells and erythrocytes. II. Effect of X-ray, inflammation, sensitization and tumor growth. *Cancer*, 20: 1914-1919, 1967.
- 16) Pressmann JJ and Simon MB.: Experimental evidence of direct communication between lymph nodes and vein. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 113: 537, 1961.
- 17) Pressmann JJ, Simon MB, Hand K, Miller J.: Passage of fluids, cells, and bacteria via direct communications between lymph nodes and veins. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 115: 207-214, 1962.
- 18) Pressmann JJ, Dunn RF, Burtz M.: Lymphnode ultra-structure related to direct lymphaticovenous communication. *Surg. Gynecol. Obstet.*, 124: 963-973 1967.
- 19) Fisher B and Fisher ER.: Studies concerning the regional lymph node in cancer. I. Initiation of immunity. *Cancer*, 27: 1001-1004, 1971.
- 20) Goldfarb PM and Hardy MA.: The immunologic responsiveness of regional lymphocytes in experimental cancer. *Cancer*, 35: 778-783, 1975.
- 21) Barna B and Deodhar SD.: The activity of regional nodes in the evolution of immune responses to allogeneic and isogeneic tumors. *Cancer Res.*, 35: 920-926, 1975.
- 22) Tsakraklides V, Olson P, Kersey JH, Good A.: Prognostic significance of the regional lymph node histology in cancer of the breast. *Cancer*, 34: 1259-1267, 1974.
- 23) Tsakraklides E, Tsakraklides V, Ashikari H, Rosen PP, Siegal FP, Robbins GF, Good RA.: In vitro studies of

- axillary lymph node cells in patients with breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 54: 549-556, 1975.
- 24) Tsakraklides V, Wanebo HJ, Sternberg SS, Stearns M, Good RA.: Prognostic evaluation of regional lymph node morphology in colorectal cancer. *Am. J. Surg.*, 129: 175-180, 1975.
- 25) Van Nagell JR Jr, Donaldson ES, Parker JC, van Dyke AM, Wood EG.: The prognostic significance of pelvic lymph node morphology in carcinoma of the uterine cervix. *Cancer*, 39: 2624-2632, 1977.
- 26) Kaufmann M, Wirth K, Schemer J, Zimmerman A, Luseietti F, Stjernswand J.: Immunomorphological lymph node changes in patients with operable bronchogenic squamous cell carcinoma. *Cancer*, 39: 2371-2377, 1977.
- 27) Abe R. and Taneichi N.: Lymphatic metastasis in experimental cecal cancer. Effectiveness of lymph nodes on barriers to the spread of tumor cells. *Arch. Surg.*, 104: 95-98, 1972.
- 28) 種市 襄 : 盲腸癌のリンパ行性転移に関する実験的研究
リンパ節の腫瘍細胞に対する防御作用, 日外会誌, 72: 24-38, 1971.
- 29) 廣崎 晃雄: 皮下移植腫瘍のリンパ行性転移に関する研究
特に手術と宿主栄養に関連して, 日外会誌, 85: 6-16, 1983.
- 30) Kodama T, Gotohda E, Takeichi N, Kuzumaki N, Kobayashi H.: Histopathology of regression of tumor metastasis in the lymph nodes. *Cancer Res.*, 35: 1628-1636, 1975.
- 31) Barna BP and Deodhar SD.: Immunological activity of regional lymph nodes in tumor-bearing mice. *Cancer Res.*, 39: 2711-2717, 1979.
- 32) Yoshida K and Tachibana T.: Studies on lymphatic metastasis. I. Primary immunoregulatory role of regional lymph nodes in the establishment of lymphatic metastasis. *J. Natl. Cancer Inst.*, 75: 1049-1058, 1985.
- 33) Tachibana T and Yoshida K.: Role of the regional lymph node in cancer metastasis. *Cancer metastasis Rev.*, 5: 55-66, 1986.
- 34) 橘 武彦, 吉田菊喜 : リンパ節転移とリンパ節の機能.
Minophagen Med. Rev., 31: 219-228, 1986.
- 35) Perussia B, Starr S, Abraham S, Fanning V, Trinchieri G.: Human natural killer cells analyzed by B73.1,

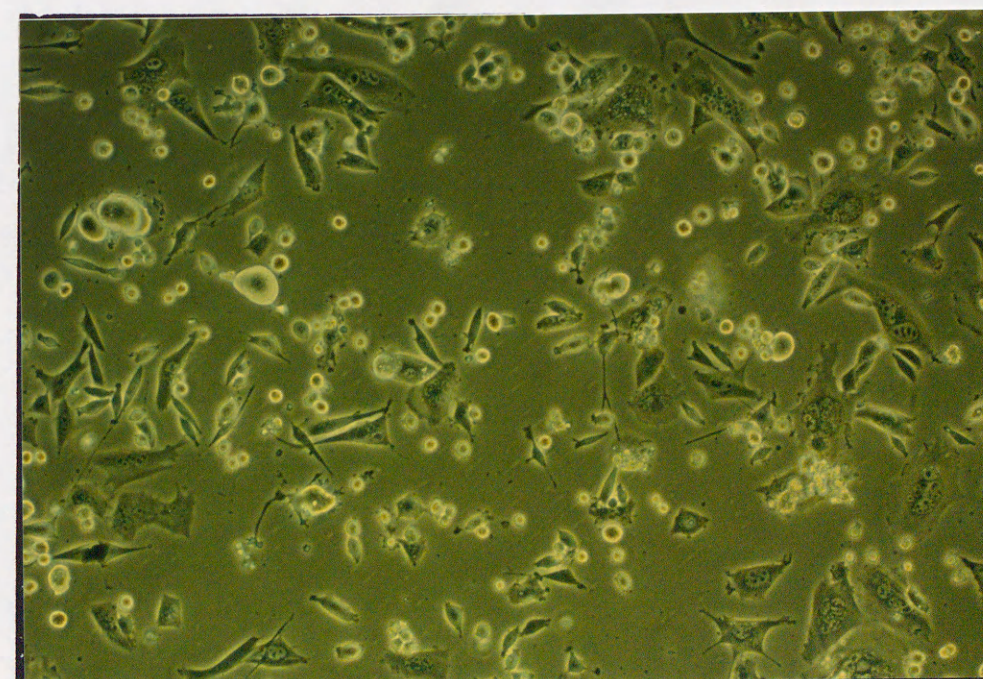
- a monoclonal antibody blocking Fc receptor functions.
I. Characterization of the lymphocyte subset reactive with B73.1. *J. Immunol.*, 130: 2133, 1983.
- 36) Fukui H, Overton WR, Herberman RB, Reynolds CW. : Natural killer cell activity in the rat. VI. Characterization of rat large granular lymphocytes as effector cells in natural killer and antibody-dependent cellular cytotoxic activities. *J. Leuk. Biol.*, 41: 130, 1987.
 - 37) Fresa KL, Korngold R, Murasko DM.: Induction of natural killer cell activity of thoracic duct lymphocytes by polyionosic-polycytidylic acid (poly I:C) or interferon. *Cell. Immunol.*, 91: 336, 1985.
 - 38) Chin Y-H, Cai J-P, Johnson K.: Lymphocyte adhesion to cultured Peyer's patch high endothelial venule cells is mediated by organ-specific homing receptors and can be regulated by cytokines. *J. Immunol.*, 145: 3669-3677, 1990.
 - 39) Springer TA.: Adhesion receptors of the immune system. *Nature*, 346: 425-433, 1990.
 - 40) Pober JS, Bevilacqua M, Mendrick D, LaPierre L, Fiers W, Gimbrone M Jr.: Two distinct monokines, interleukin-1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells. *J. Immunol.*, 136: 1680, 1986.
 - 41) Pober JS, Gimbrone M Jr, LaPierre L, Mendrick D, Fiers W, Pothelin R, Springer T. : Overlapping patterns of activation of human endothelial cells by interleukin-1, tumor necrosis factor and immune interferon. *J. Immunol.*, 137: 1893, 1986.
 - 42) Nicolson GL, Bellon PN, Tressler RJ, Dulski K, Inoue T, Cavanaugh PG. : A adhesive, invasive, and growth properties of selected metastatic variants of a murine large-cell lymphoma. In *vasion Metastasis*, 9: 102-116, 1988.
 - 43) Carter RL and Gershon RK.: Studies on homotransplantable lymphomas in hamsters. I. Histologic response in lymphoid tissues and their relationship to metastasis. *Am. J. Pathol.*, 49: 637-655, 1966.

☒ 1

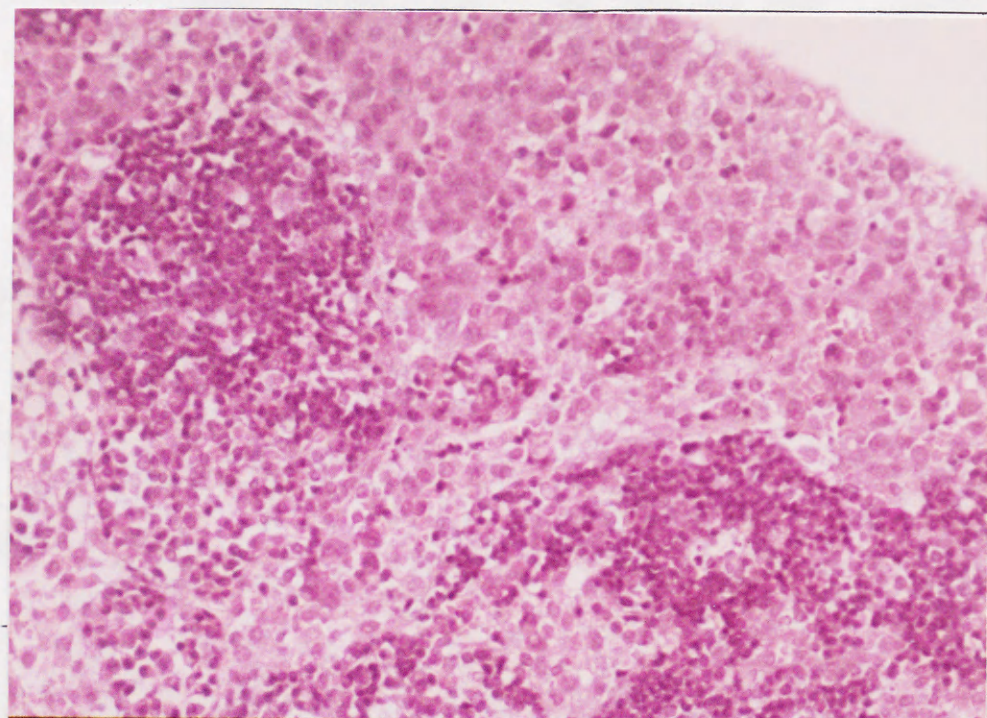
M⁺



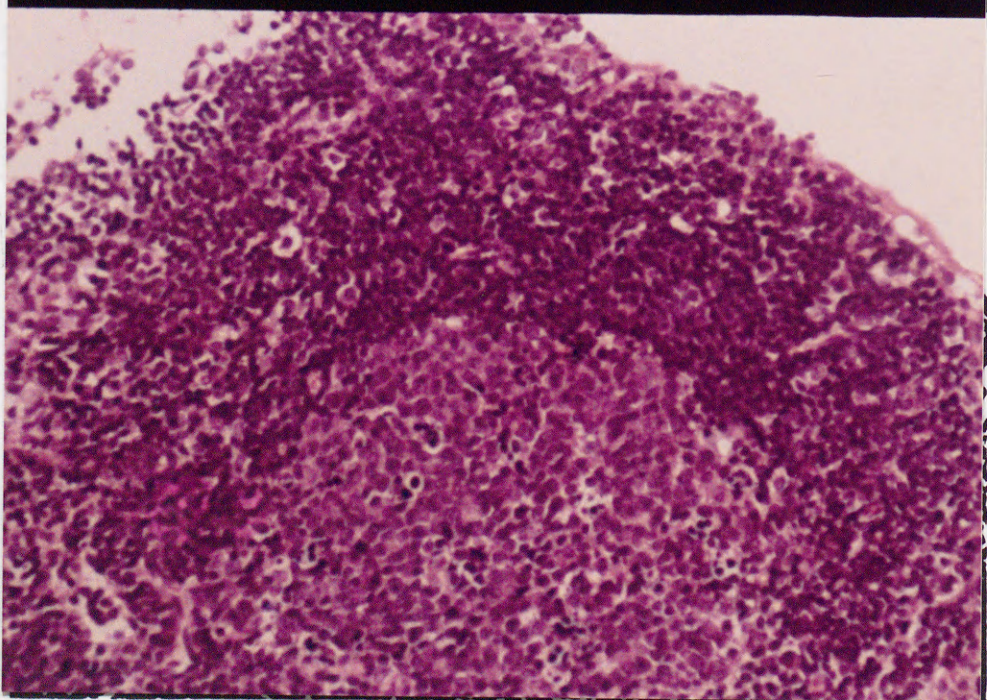
M2B



M⁺

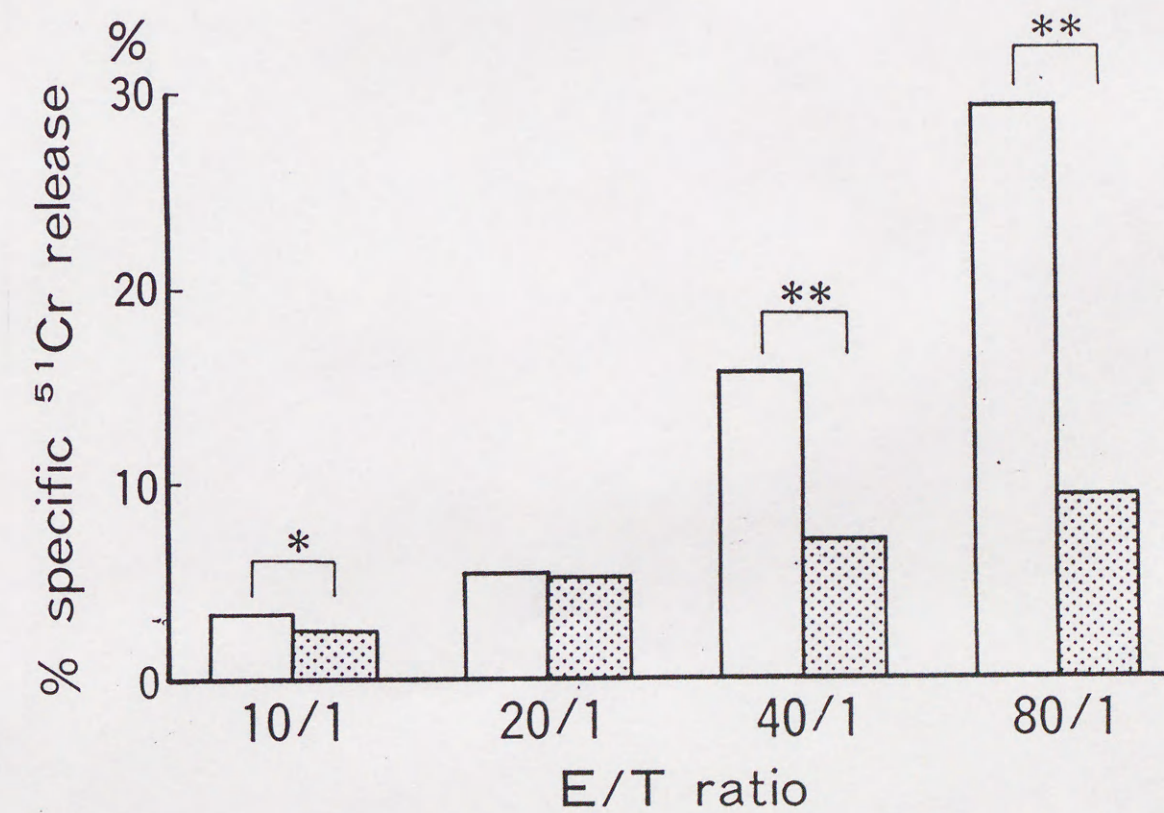
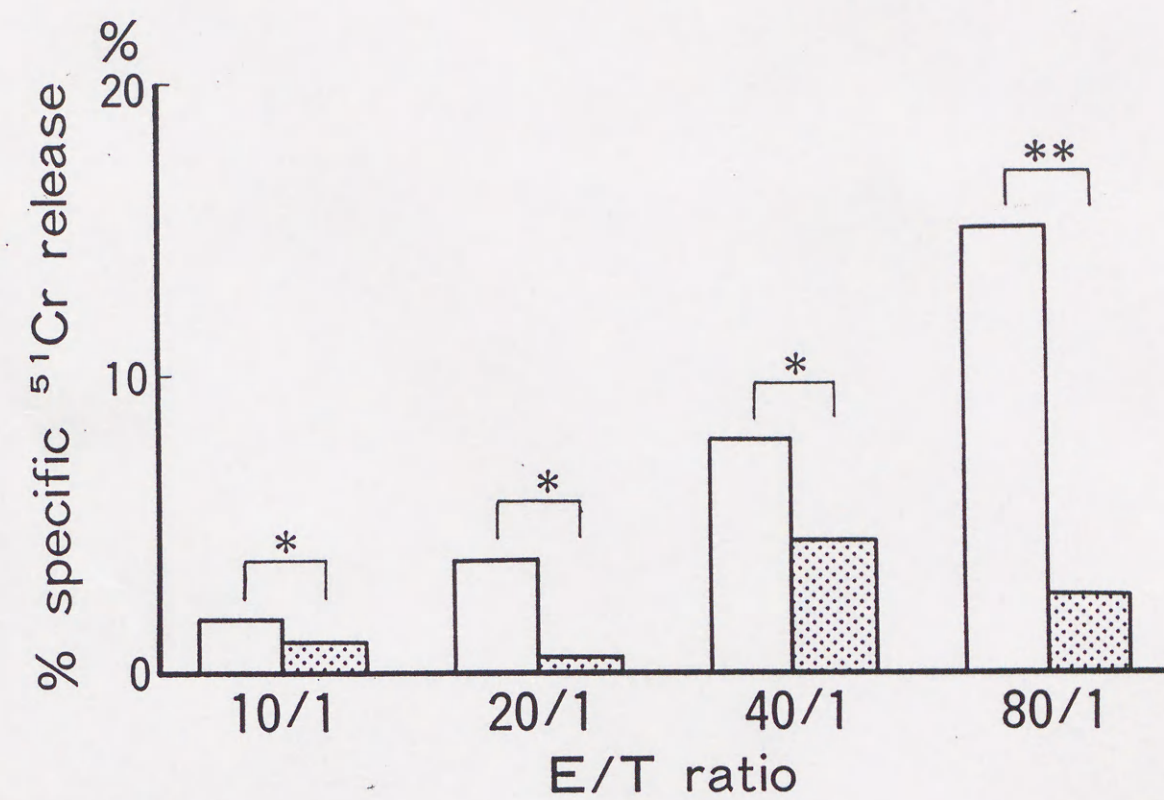


M2B

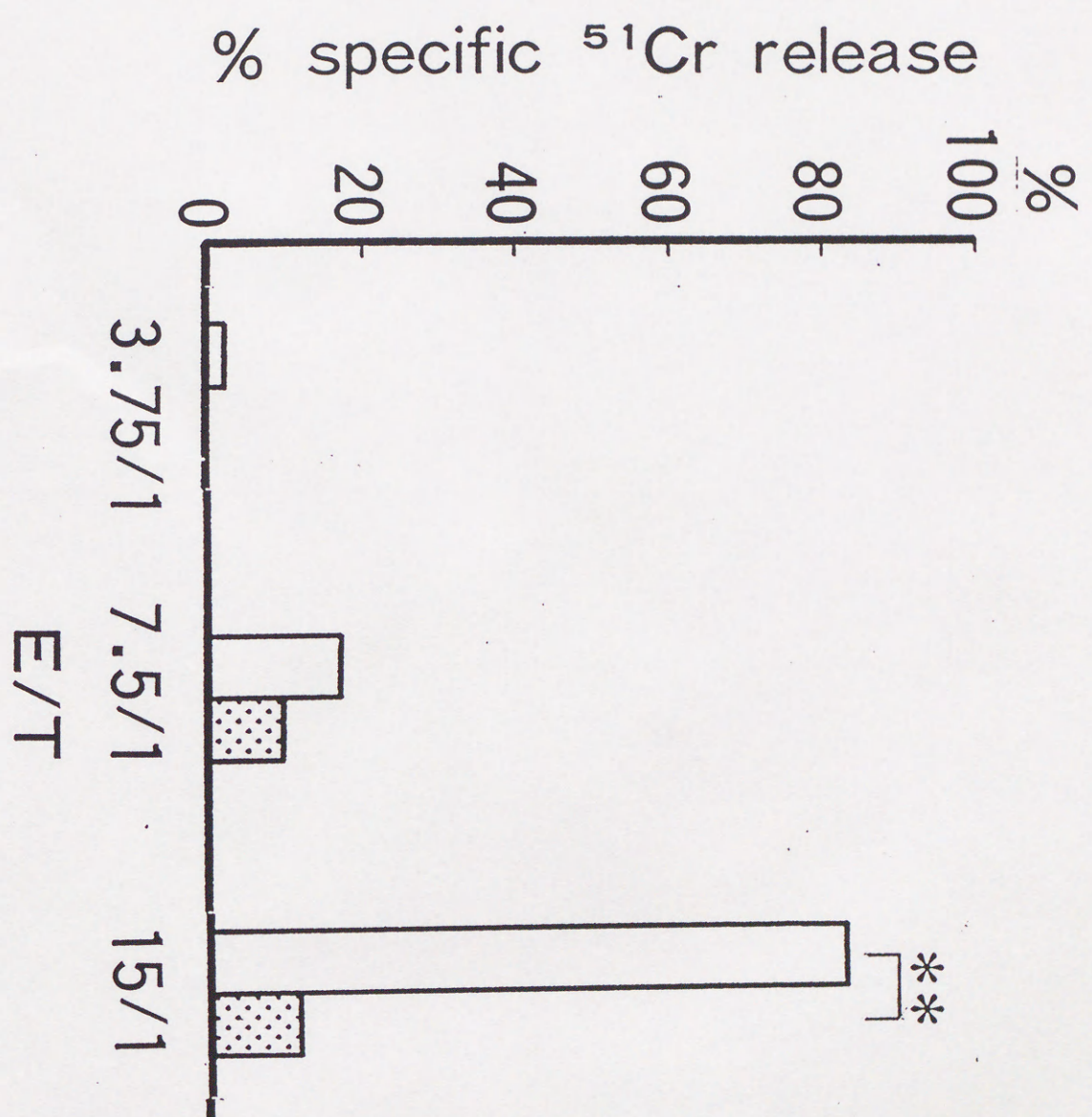


2

3



5



4

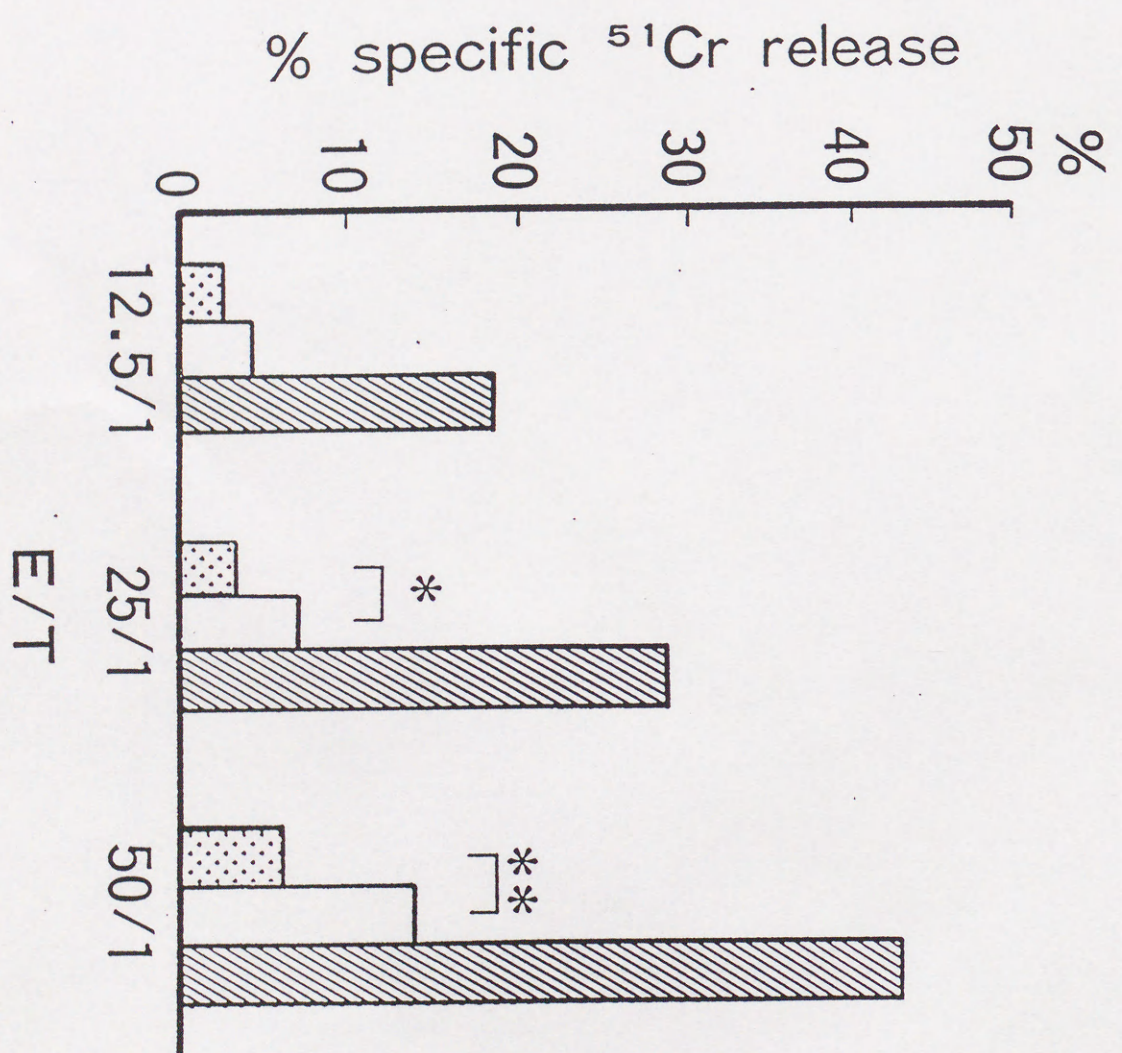


图 7

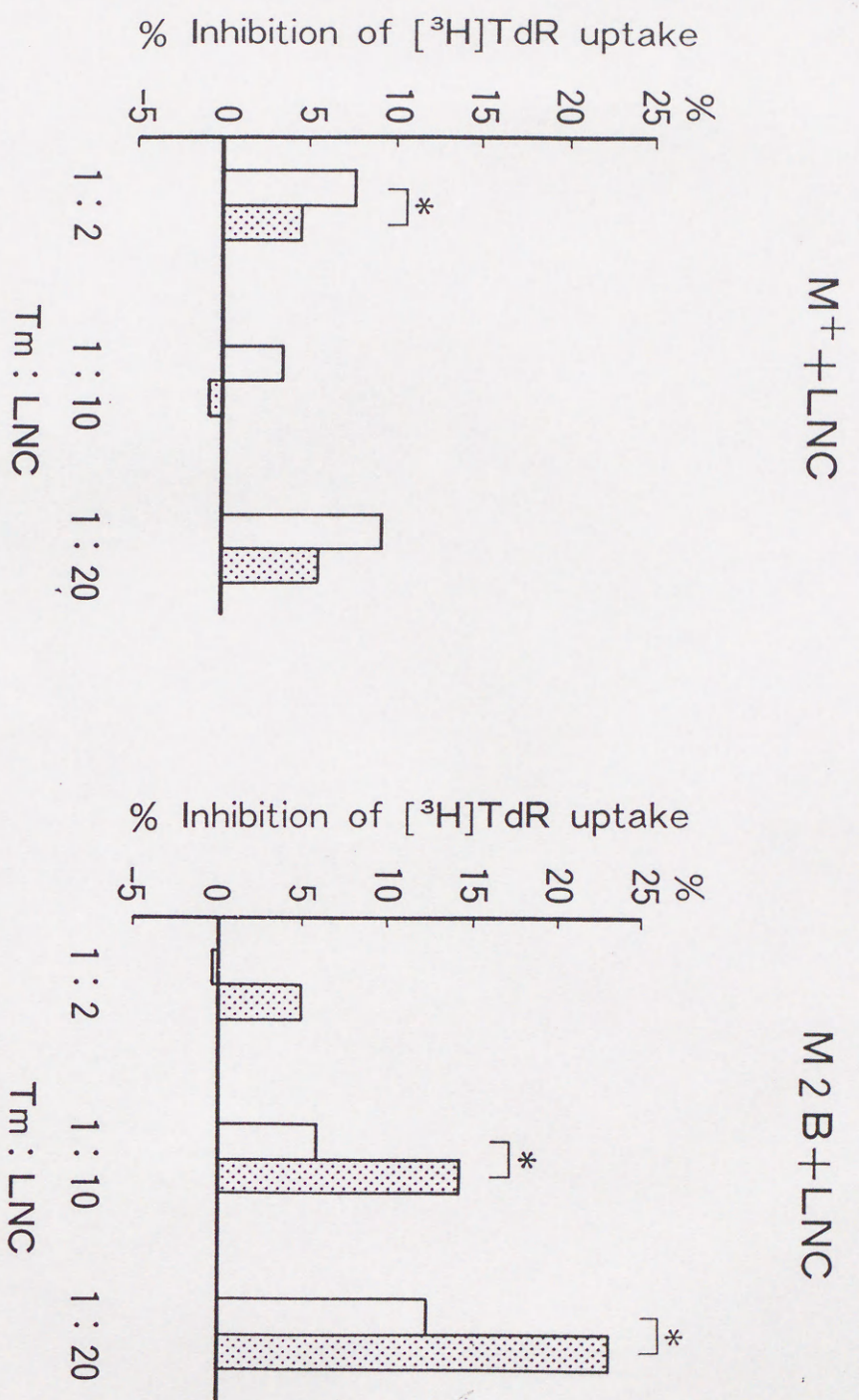
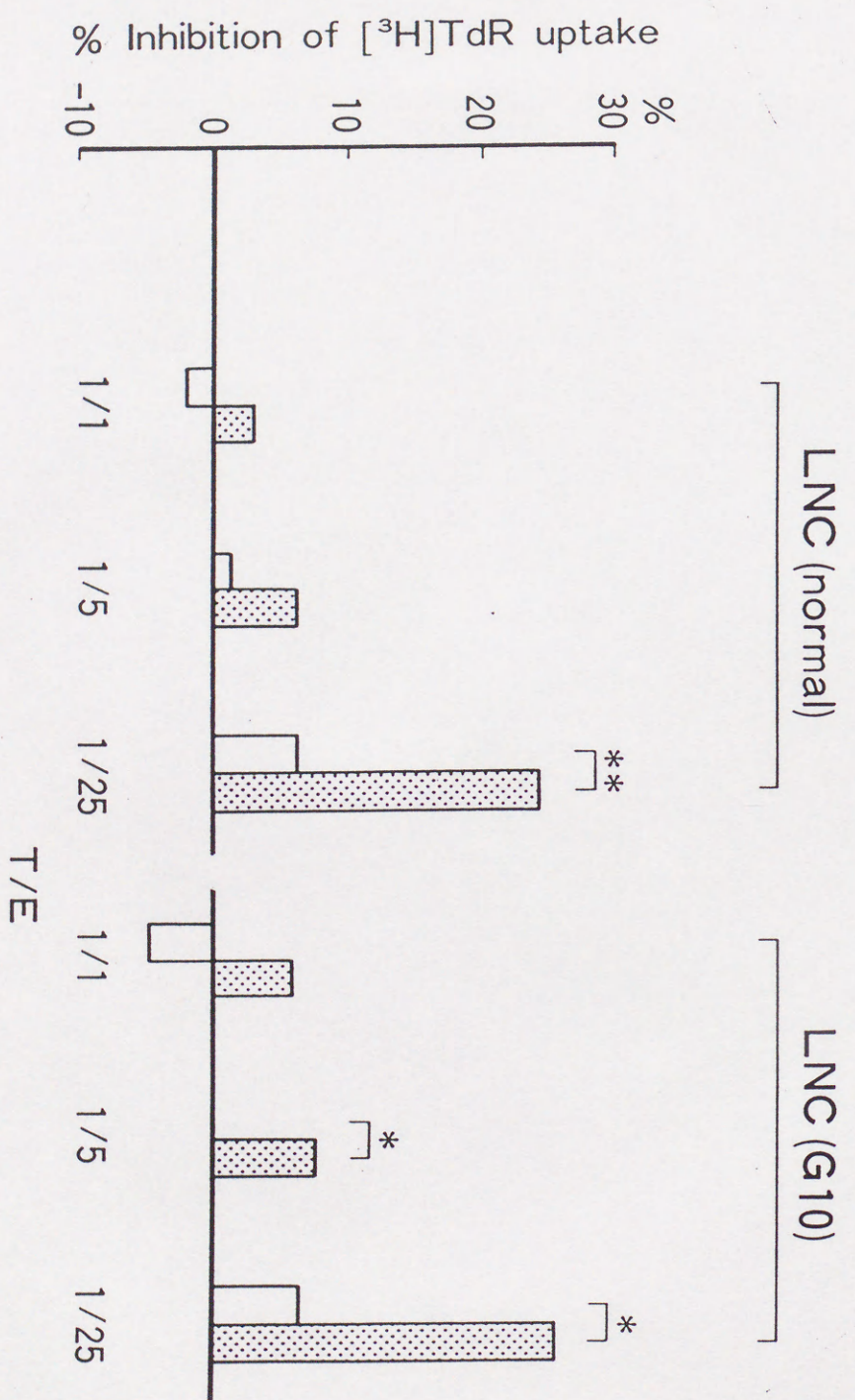
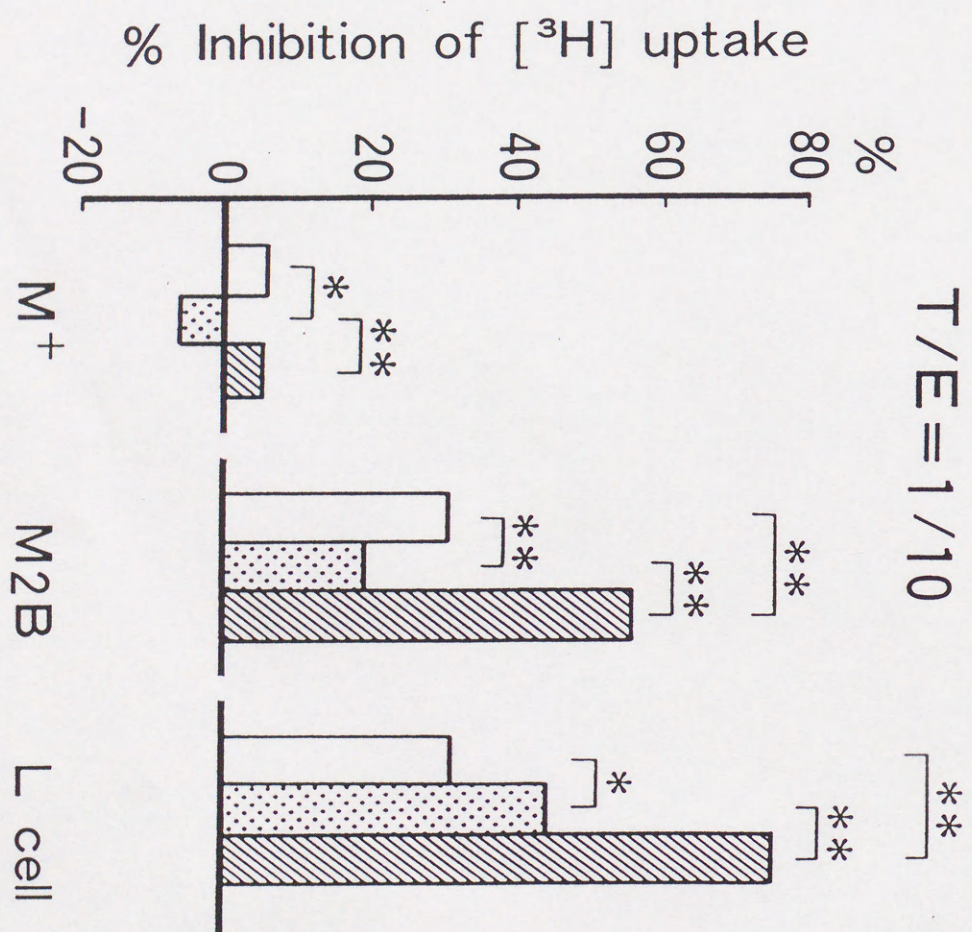
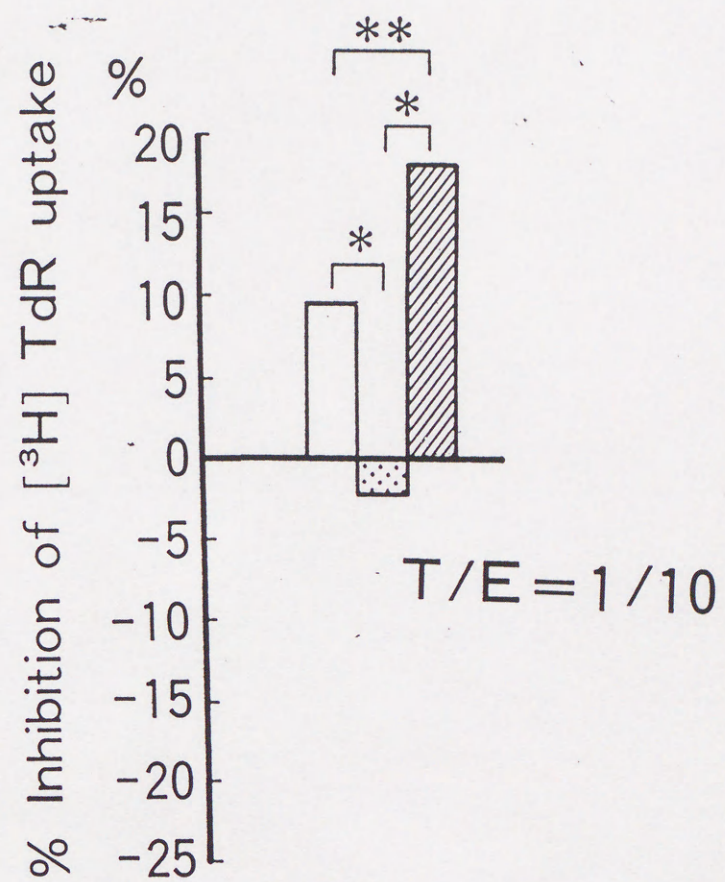


图 6





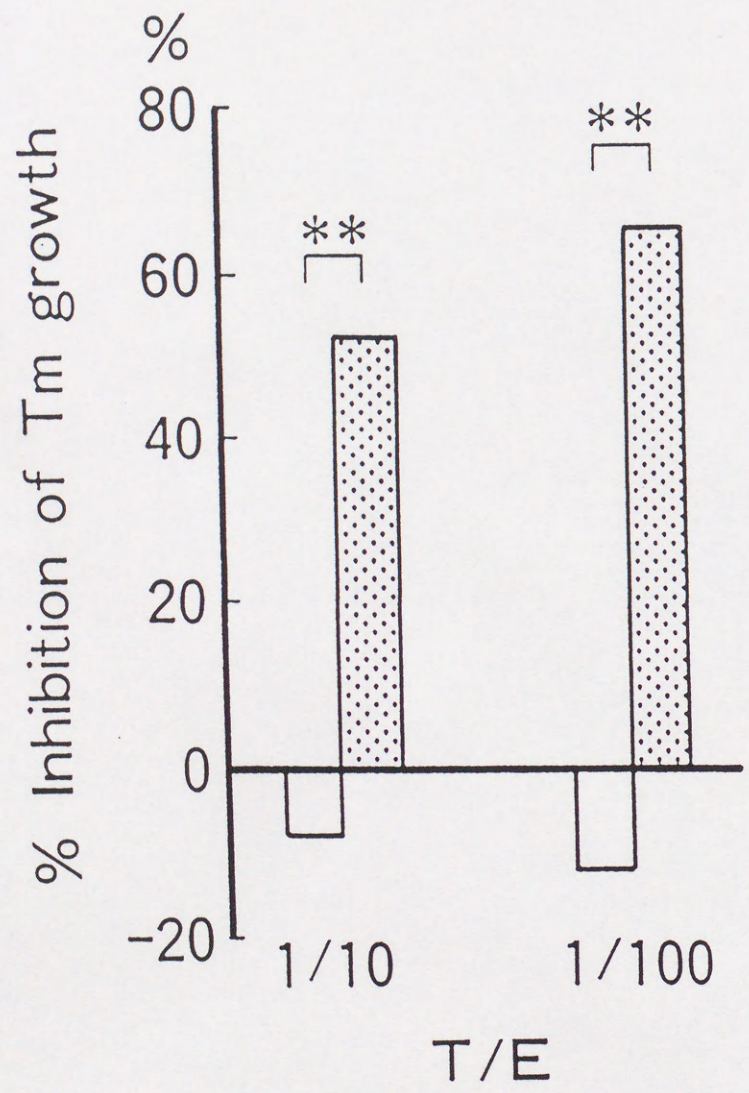
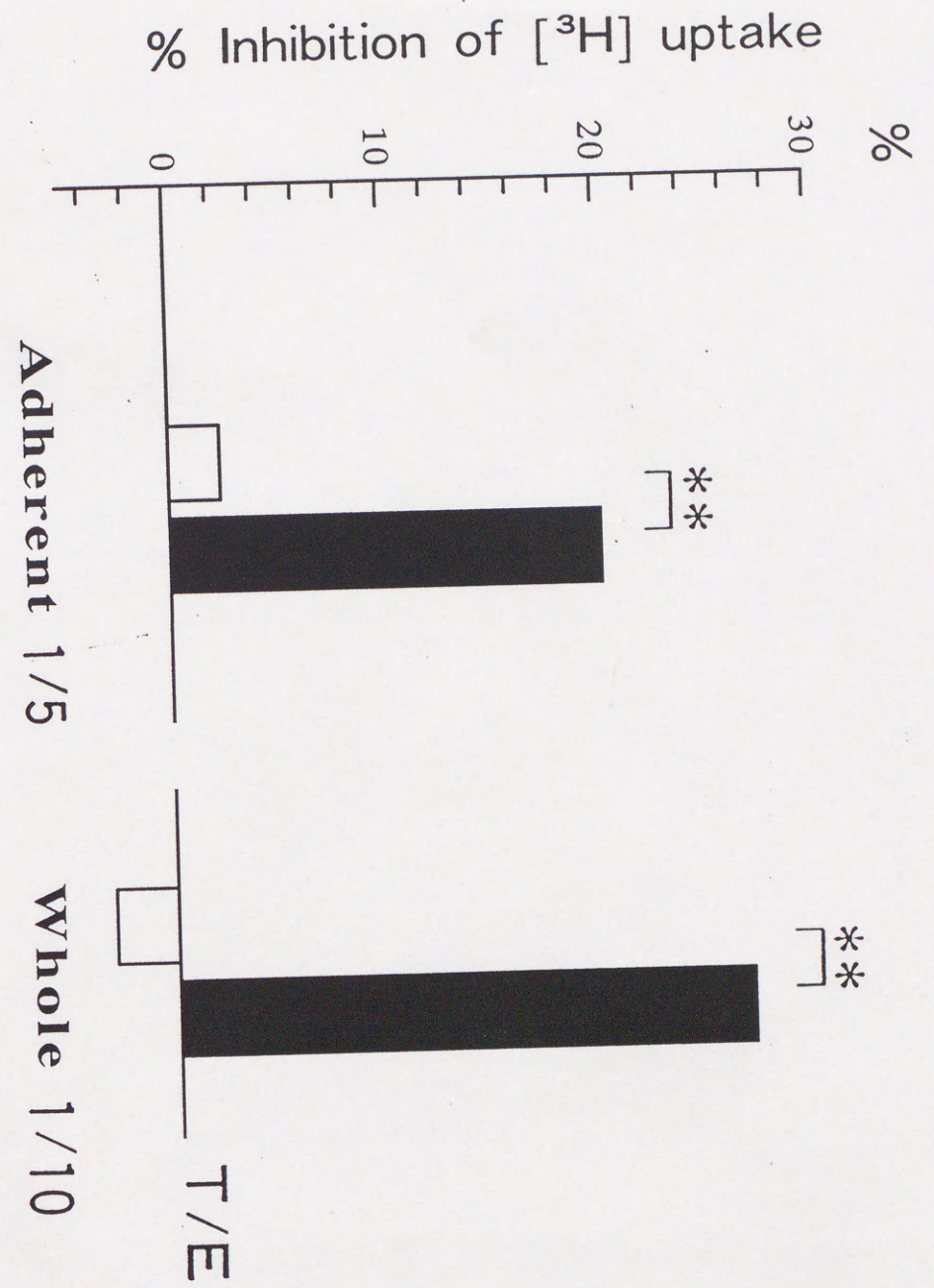
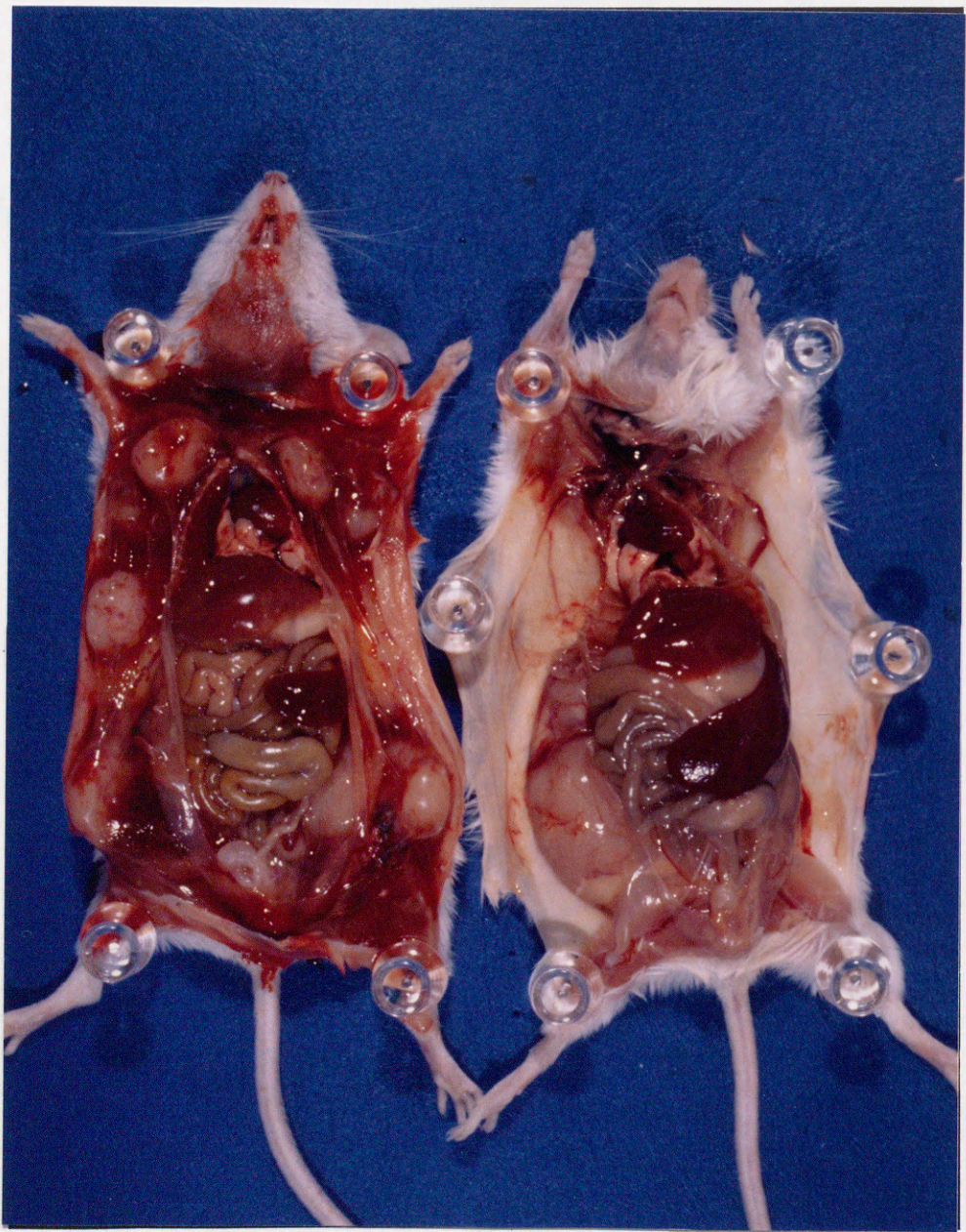


表 1

| Cytotoxic activity | | Cytostatic activity |
|--------------------|-----------------------|------------------------|
| Type | CTL, NK, activated Mφ | non-T (B, resident Mφ) |
| Cell contact | essential | not-essential |
| Normal | not detectable | detectable |
| Tm-bearing | not detectable | increased |



M⁺

M2B

Legends for Figures

- ☒ 1 . Cultured tumor cells. M⁺ (upper panel) was more homogeneous and rich in adherent population than M2B (lower panel). X100.
- ☒ 2 . Histology of lymph nodes of tumor-bearing mice. Left panel; tumor cells (M⁺) grown in subcapsular sinus, and invaded into interfollicular space and follicles. Right panel; no tumor cell (M2B) grown, but formation of germinal center was seen. X200.
- ☒ 3 . CTL cytotoxicity towards M⁺ (□) and M2B (▣). As effector cells used were M⁺-immune spleen cells (upper panel) and M2B-immune spleen cells (lower panel). Values represent mean percent specific lysis of triplicate assay wells, and represent the results of different experiments. SD were less than 10%. Statistical significance: * P<0.05 ** P<0.01
- ☒ 4 . Natural killer cytotoxicity towards M⁺ (□), M2B (▣) and YAC-1 (▨). As effector cells used were spleen cells from mice which were i.v. injected 0.01 mg poly(I:C) 3 days prior to use. Values represent mean percent specific lysis of triplicate assay wells, and represent the results of different experiments. SD were less than 10%. Statistical significance: * P<0.05 ** P<0.01
- ☒ 5 . Activated macrophage cytotoxicity towards M⁺ (□) and M2B (▣). As effector cells used were macrophages collected from PEC of mice which recieved 0.1 mg OK432 i.v. 4 days prior to use. Values represent mean percent specific lysis of triplicate assay wells, and represent the results of different experiments. SD were less than 10%. Statistical significance: ** P<0.01
- ☒ 6 . Percent inhibition of [³H]TdR uptake by M⁺ (□) and M2B (▣), co-cultured with graded numbers of lymph node cells (left panel; no-treatment, right panel; sephadex G-10 treatment) for 2-3 days. [³H]TdR was added for the final 24 hr of culture. Values represent mean percent inhibition of

[³H]TdR uptake of at least quadruplicate assay wells, and represent the results of different experiments. SD were less than 10%. [³H]TdR uptake of lymph node cells alone were negligible. Statistical significance:

* P<0.05 ** P<0.01

- ☒ 7 . Percent inhibition of [³H]TdR uptake by M⁺ (left panel) and M2B (right panel), co-cultured with graded numbers of lymph node cells (□; normal, ▣; tumor-bearing) for 72 hr. [³H]TdR was added for the final 24 hr of culture. Values represent mean percent inhibition of [³H]TdR uptake of at least quadruplicate assay wells, and represent the results of different experiments. SD were less than 10%. [³H]TdR uptake of lymph node cells alone were negligible. Statistical significance: * P<0.05
- ☒ 8 . Percent inhibition of [³H]TdR uptake by M⁺ (left panel), M2B (median panel) and L cell (right panel), co-cultured with lymph node cells (□; normal, ▣; M⁺-bearing, ▨; M2B-bearing) at a target-effector ratio of 1/10 for 66 hr. [³H]TdR was added for the final 18 hr of culture. Values represent mean percent inhibition of [³H]TdR uptake of at least quadruplicate assay wells, and represent the results of different experiments. SD were less than 10%. [³H]TdR uptake of lymph node cells alone were negligible. Statistical significance: * P<0.05 ** P<0.01
- ☒ 9 . Percent inhibition of [³H]TdR uptake by M2B, co-cultured with lymph node cells after antibody treatment (□; complement only, ▣; B220, α-κ, α-λ + complement, ▨; Thy-1 + complement) at a target-effector ratio of 1/10 for 72 hr. [³H]TdR was added for the final 24 hr of culture. Values represent mean percent inhibition of [³H]TdR uptake of at least quadruplicate assay wells, and represent the results of different experiments. SD were less than 10%. [³H]TdR uptake of lymph node cells alone were negligible. Statistical significance: * P<0.05 ** P<0.01
- ☒ 10 . Percent growth inhibition of M⁺ (□) and M2B (▣), co-cultured with graded numbers of lymph node cells for 114 hr. Culture Plate Inserts were used for separation of tumors and lymphocytes. After incubation, the inserts were removed and the number of tumor cells was counted with a Coulter Counter. Values represent mean percent inhibition of tumor growth

of triplicate assay wells, and represent the results of different experiments. SD were less than 10%. Statistical significance: ** $P < 0.01$

图 1 1 . Percent inhibition of [^3H]TdR uptake by M $^+$ (□) and M2B(■), co-cultured with adherent PEC (left panel, T/E=1/5) or whole PEC (right panel, T/E=1/10) for 72 hr. PEC were obtained from naive mice. [^3H]TdR was added for the final 24 hr of culture. Values represent mean percent inhibition of [^3H]TdR uptake of at least quadruplicate assay wells, and represent the results of different experiments. SD were less than 10%. [^3H]TdR uptake of PEC alone were negligible. Statistical significance: ** $P < 0.01$

图 1 2 . Photograph of tumor-bearing mice. Left panel: Metastatic lymph nodes of M $^+$ -bearing mice. Axillar and inguinal lymph nodes were swollen. Implanted with 2×10^5 tumor cells 5 weeks before. Right panel: Non-metastatic lymph nodes of M2B-bearing mice. Implanted with 1×10^6 tumor cells 8 weeks before.

表 1 . Comparison between cytotoxic activity and cytostatic activity.

